

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-103595

(43)公開日 平成5年(1993)4月27日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 J 3/34		7236-4B		
3/08		7236-4B		
A 2 3 L 1/305		8214-4B		
C 1 2 P 21/06		8214-4B		
// A 6 1 K 37/18		8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数2(全9頁)

(21)出願番号	特願平3-298018	(71)出願人	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22)出願日	平成3年(1991)10月18日	(71)出願人	000216162 天野製菓株式会社 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号
		(72)発明者	佐渡 秀樹 埼玉県川越市南大塚1225-1 ユーハウス 1-301
		(72)発明者	宿野部 幸孝 埼玉県川越市古谷上6083-8、B2-205
		(74)代理人	弁理士 藤野 清也
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 牛乳ホエータンパク加水分解物の製造方法

(57)【要約】

【構成】 ブロメライン、パパイイン等の植物由来のタンパク分解酵素を用いて濃度5～20重量%に調整した牛乳ホエータンパク水溶液の該タンパク中のβ-ラクトグロブリンを選択的に加水分解する牛乳ホエータンパク酵素加水分解物の製造法。

【効果】 高濃度の牛乳ホエータンパク水溶液を加水分解することができるので効率的に低アレルギー化された牛乳ホエータンパク加水分解物を得ることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 濃度5～20重量%に調整した牛乳ホエータンパク水溶液に植物由来のタンパク分解酵素を加えて、該タンパク中のβ-ラクトグロブリンを選択的に加水分解することを特徴とする牛乳ホエータンパク加水分解物の製造法。

【請求項2】 植物由来のタンパク分解酵素が、プロメラインおよび/またはパパインである請求項1に記載の牛乳ホエータンパク酵素加水分解物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、植物由来のタンパク分解酵素を用いて効率よく牛乳ホエータンパク加水分解物を製造する方法に関する。本発明の方法によるとβ-ラクトグロブリンが選択的に加水分解されるので、低アレルギー化された牛乳ホエータンパク加水分解物を提供することができる。

【0002】

【従来の技術】牛乳ホエータンパクにはその主成分としてβ-ラクトグロブリンが、さらにα-ラクトアルブミン、免疫グロブリンあるいは牛血清アルブミン等のタンパクが存在している。これらのタンパクは程度の大小はあるが全てアレルギーとなる。特に、β-ラクトグロブリンは母乳中に存在せず、アレルギー患児に対して強いアレルギーとなる。

【0003】従来、牛乳ホエータンパクの低アレルギー化方法として、タンパク分解酵素を使用した加水分解処理が知られていた。特に、強いアレルギーであるβ-ラクトグロブリンの酵素加水分解や除去には、ある特定の酵素を使用した選択的分解する方法あるいはその他の処理手段を施すことによる除去する方法が知られている。

【0004】例えば、Hayashi等のFood Sci., 52, 1107 (1987)には、超高压下におけるβ-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンの圧変性の受けやすさの違いを利用し、200MPaの超高压下でタンパク分解酵素であるサーモライシン（大和化成（株）、Thermolysin）を使用してβ-ラクトグロブリンを選択的に分解除去する方法が記載されている。

【0005】また、特開平2-265441号公報には、ウシトリプシン（Sigma社、T-8003）、枯草菌由来のタンパク分解酵素（NOVO社、Neutrase）とアスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）由来のタンパク分解酵素（天野製薬（株）、Protease A）を使用し、pH7～9、30～40℃、30分～20時間処理することによりβ-ラクトグロブリンを選択的に分解する方法が記載されている。

【0006】更に、特開平3-19654号公報では、ホエータンパクを含む出発原料からラクトグロブリンを

除去するために、強塩基型陰イオン交換器を使用する方法が記載されている。

【0007】上記方法によるβ-ラクトグロブリンの選択的分解あるいは選択的除去は、例えば、高压下でのβ-ラクトグロブリンの選択的分解は、大量処理が困難であり、また、使用するタンパク分解酵素が高価であるうえ、高压装置を使用せねばならず、コストアップになってしまう。

【0008】また、ウシトリプシン、枯草菌由来のタンパク分解酵素、アスペルギルス・オリゼ（*Aspergillus oryzae*）由来のタンパク分解酵素を使用したβ-ラクトグロブリンの選択的分解は、基質濃度が1%と低いためコストアップになり、また、基質濃度1%で処理するためβ-ラクトグロブリンの分解が進行するとともにα-ラクトアルブミンの分解も進行し、その結果、α-ラクトアルブミンの含有量の低いβ-ラクトグロブリンの選択的分解物になってしまう。更に、これらの酵素を使用することによっても得られる分解物はそのアレルギー性が十分に低下していない。

【0009】強塩基型陰イオン交換器使用したホエータンパクを含む出発原料からのラクトグロブリンの除去は、その収率が低く、コストアップになってしまう。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、牛乳ホエータンパクに含まれるβ-ラクトグロブリンを選択的に加水分解してアレルギー性を低減し、かつα-ラクトアルブミン含量の比較的高い牛乳ホエータンパク加水分解物を製造する方法について種々検討したところ、植物由来のタンパク分解酵素であるプロメラインやパパインを用いることによって、牛乳ホエータンパクの濃度を5～20重量%に高めて加水分解することができることを見出し本発明を成すに至った。

【0011】したがって、本発明は、植物由来のタンパク分解酵素を用いて、効率よく牛乳ホエータンパク加水分解物を製造する方法を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、牛乳ホエータンパク濃度5～20重量%に調製された牛乳ホエータンパク水溶液に植物由来のタンパク分解酵素を添加して牛乳ホエータンパク中のβ-ラクトグロブリンを選択的に分解し、アレルギー性の低い牛乳ホエータンパク酵素分解物を製造する方法に関する。さらに、具体的には、5～20%の牛乳ホエータンパク水溶液をNaOH、KOHやCa(OH)₂でpH7～9に調整し、植物由来のタンパク分解酵素を20～500u/g-WPC添加し、40～60℃、30分～12時間処理し、加水分解終了後、プレート式熱交換機により加熱することで酵素を失活させ、凍結乾燥機又は噴霧乾燥機で乾燥し、アレルギー性が低く、分解物濃度の高い牛乳ホエータンパク酵素分解物を得る方法に関する。

【0013】本発明における酵素は、植物由来のタンパク分解酵素であって、このような酵素としてプロメライン(天野製薬(株)、BromelainF)、パパイン(天野製薬(株)、PapainW)等を例示することができる。また、酵素は1種類又は2種類以上でも使用でき、複数の酵素を使用する場合は植物由来のタンパク分解酵素のプロメラインやパパインと植物以外の起源に由来する他のタンパク分解酵素とを併用することが有効である。

【0014】酵素反応は、前記したように牛乳ホエータンパク5~20重量%を含有する水溶液をpH7~9に調整し、前記タンパク分解酵素を添加し、40~60℃で30分~12時間酵素分解を行なう。

【0015】従来の方法では、牛乳タンパク1重量%を含有する溶液でタンパク分解酵素処理が行なわれていたが、本発明では前記したタンパク分解酵素を使用することによって効率的に高濃度の牛乳タンパク酵素分解物を得ることができる。この点が本発明の大きな特徴のひとつである。

【0016】酵素分解終了後の酵素失活は、プロメラインやパパイン等の酵素についてはプレート式熱交換機を用い、125℃5秒間の加熱で行うことができ、 α -ラクトアルブミンを変性させずに加熱して酵素失活し、分解物を得ることができる。得られる溶液はそのままあるいは濃縮するか乾燥粉末化して低アレルギー化食品の原料として利用することができる。本発明の方法によると β -ラクトグロブリンが選択的に分解され、 α -ラクトアルブミンが発原原料の50%以上をしめる牛乳ホエータンパク分解物を得ることができる。本発明の方法によって得られる牛乳ホエータンパクは、 α -ラクトアルブミンと β -ラクトグロブリンとの比率は、その分子量に差があることを利用してその分子量分布をSwergoldらの方法[Analytical Biochemistry, 131, 295 (1983)]で測定することによって知ることができる。

【0017】分子量分布の測定は、下記に示す条件で行うことができる。

- (1) 試料濃度: 0.05%
- (2) 注入量: 20 μ l
- (3) カラム: TSKgel G3000PW_{XL}
- (4) 溶媒: 0.1%トリフルオロ酢酸含有 55%アセトニトリル溶液
- (5) 溶媒速度: 0.30ml/min
- (6) 検出波長: 210nm
- (7) 分析温度: 20~30℃

【0018】また、ホエータンパク分解物のアレルギー性はInhibition ELISA試験[日本小児アレルギー学会誌, 1, 36 (1987)]あるいはMotaらのPCA(受身皮膚アナフィラキシー法)による抗原抗体反応[Life Science 8 813

(1969)]によって確認することができる。

【0019】 β -ラクトグロブリンを指標としたInhibition ELISA試験に使用した溶液等は下記のように調製することができる。

【0020】(1) β -ラクトグロブリンのコーティング: 0.05MのNaHCO₃-Buffer 11mlに β -ラクトグロブリン(1mg/ml)を100 μ l溶解し、分注(100 μ l/well)する。

(2) サンプル: サンプル200mgをPBSに1mlに溶解する。

(3) ヤギ全血清希釈液: ヤギ全血清34 μ lをPBS-tween20 5.1mlに溶解する。

(4) 抗 β -ラクトグロブリン(β -Lg)ウサギ血清希釈液: 抗 β -Lgウサギ血清34 μ lをPBS-tween20 5.1mlに溶解する。

(5) ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ免疫グロブリン(IgG)ヤギIgG: ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG ヤギIgG 3 μ lをPBS-tween20 10mlに溶解する。

(6) ABTS溶液: ABTS (2, 2'-Azino-bis-3-ethyl benzthiazoline sulfonic acid) 3mgを脱イオン水 5mlに溶解し、0.006% H₂O₂-0.2Mクエン酸Na緩衝液・pH4.0 (ABTS用Buffer) 5mlと混合する。

【0021】また、PCAによる抗原抗体反応における抗血清の調製及びPCAによる判定は、下記のように行うことができる。

【0022】(1) 抗血清の調製: Al(OH)₃ 4.0mgを200ml PBSに媒散後滅菌した液20mlとタンパク当量として10mg/mlとなるように反応液をPBSにより希釈した1mlをPBSで100mlにメスアップした溶液20mlを振盪混合したもの400 μ l(抗原として20 μ gを含有)を11日間馴化飼育したBALB/cマウス(5週齢の雄)に4週間に渡り1週間隔で5回に分けて腹腔内投与した。第5回投与5日後に大腿基部を切断して全採血し、使用まで-80℃に保存した。

【0023】(2) PCAによる判定: 生理食塩水を用い、上記抗血清の調製にて得たマウス抗 α -ラクトアルブミン血清、マウス抗 β -ラクトグロブリン血清、マウス抗ペプチド血清の1/2希釈列(1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/100)を作り、各希釈血清50 μ lを背毛を刈ったSD系ラット(10週齢の雄)の背部に皮下注射する。24時間後に、各ペプチド溶液(抗原として1mgを含有)を含む0.6%エバンブルー液 1.0mlを尾静脈より注射し、30分後屠殺し、背部皮膚をはいて紫斑を測定した。判定は陽性反応がでた最大の希釈倍率を抗体価とした。

【0024】次に実施例を示し、本発明をさらに詳しく

説明する。

【実施例1】牛乳ホエータンパク100gを水800gで溶解し、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ でpH8に調整し、プロメラインを100u/g-WPC添加することで10%溶液にし、pHを反応時間中8に一定にし、45℃で4時間酵素処理した。4時間後にプレート式熱交換機で125℃に5秒間加熱して酵素を失活させ、凍結乾燥し、牛乳ホエータンパク加水分解物を得た。TSKgelG3000P_{XL}のカラム（東ソー（株））と0.1%トリフルオロ酢酸含有の5%アセトニトリル溶液を使用してこの分解物の分子量分布を測定したところ、図1に示すように未分解のホエータンパクと比較してβ-ラクトグロブリンは分解されており、α-ラクトアルブミンが出発原料の50%以上の分解物を得ることができた。

【0025】

【実施例2】牛乳ホエータンパク100gを水800gで溶解し、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ でpH8に調整し、水に溶解したパパインを100u/g-WPC添加し、さらに水を加え10%溶液にし、反応時間中pHを8に一定にし、45℃で4時間酵素処理した。4時間後にプレート式熱交換機で125℃で5秒間加熱して酵素を失活させ、凍結乾燥し、牛乳ホエータンパク加水分解物を得た。分解物の分子量分布を測定したところ、図2に示すように未分解のホエータンパクと比較してβ-ラクトグロブリンは分解されており、α-ラクトアルブミンが出発原料の50%以上の分解物を得ることができた。

【0026】

【比較例1】牛乳ホエータンパク100gを水800gで溶解し、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ でpH7に調整し、水に溶解したニュートラーゼ（NOVO社、Neutrase 1.5MG）を100u/g-WPC添加し、さらに水を加え10%溶液にし、40℃で4時間酵素処理した。4時間後プレート式熱交換機で125℃で5秒間加熱することで酵素失活させ、凍結乾燥し、牛乳ホエータンパク加水分解物を得た。分解物の分子量分布を測定したところ、図3に示すように未分解のホエータンパクと比較してβ-ラクトグロブリンとα-ラクトアルブミンは分解されておらず、α-ラクトアルブミンが出発原料の50%以上の分解物を得ることができなかった。

【0027】

【比較例2】牛乳ホエータンパク100gを水800gで溶解し、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ でpH7.5に調整し、水で溶解したプロテアーゼA（天野製薬（株）、Protease A）を100u/g-WPC添加し、さらに水を加えて10%溶液にし、40℃で4時間酵素処理した。4時間後にプレート式熱交換機で125℃で5秒間加熱することによって酵素失活させ、凍結乾燥し、分解物を得た。分解物の分子量分布を測定したところ、図4に示

すように未分解のホエータンパクと比較してβ-ラクトグロブリンは分解されていたが、α-ラクトアルブミンが出発原料の50%以上の分解物を得ることができなかった。

【0028】以上の（実施例1）、（実施例2）及び（比較例1）、（比較例2）により得た分解物についてβ-ラクトグロブリンを指標としたInhibition ELISA試験を行った。その結果を図5に示す。この図ではβ-ラクトグロブリンの曲線との距離が大きいほど分解物の抗原性が小さくなることを示す。図に示すようにニュートラーゼやプロテアーゼAに比べてプロメラインとパパインは著しい抗原性の低下が認められた。

【0029】また、（実施例1）、（実施例2）及び（比較例2）により得た分解物についてPCAによる判定を行ったところ、図6～9に示すように未分解のホエータンパクと比較してプロテアーゼAはアレルギー性が残存し、プロメラインとパパインはアレルギー性の低下が認められた。

【0030】また、（実施例1）及び（実施例2）は、酵素を含めた原材料費が安価で、収率がほぼ100%であり、官能評価では苦味の発現が小さかった。

【0031】

【発明の効果】本発明によると、牛乳ホエータンパク中に多量に含まれるβ-ラクトグロブリンを植物由来の蛋白分解酵素により選択的に加水分解し、α-ラクトアルブミンがリッチな牛乳ホエータンパクの酵素加水分解物を得ることができる。得られる分解物は低アレルギー性食品として有効に利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1のプロメラインによる牛乳ホエータンパク加水分解物の分子量分布を示す。

【図2】実施例2のパパインによる牛乳ホエータンパク加水分解物の分子量分布を示す。

【図3】比較例1のニュートラーゼによる牛乳ホエータンパク加水分解物の分子量分布を示す。

【図4】比較例2のプロテアーゼAによる牛乳ホエータンパク加水分解物の分子量分布を示す。

【図5】実施例1、2及び比較例1、2のInhibition ELISA試験の結果を示す。

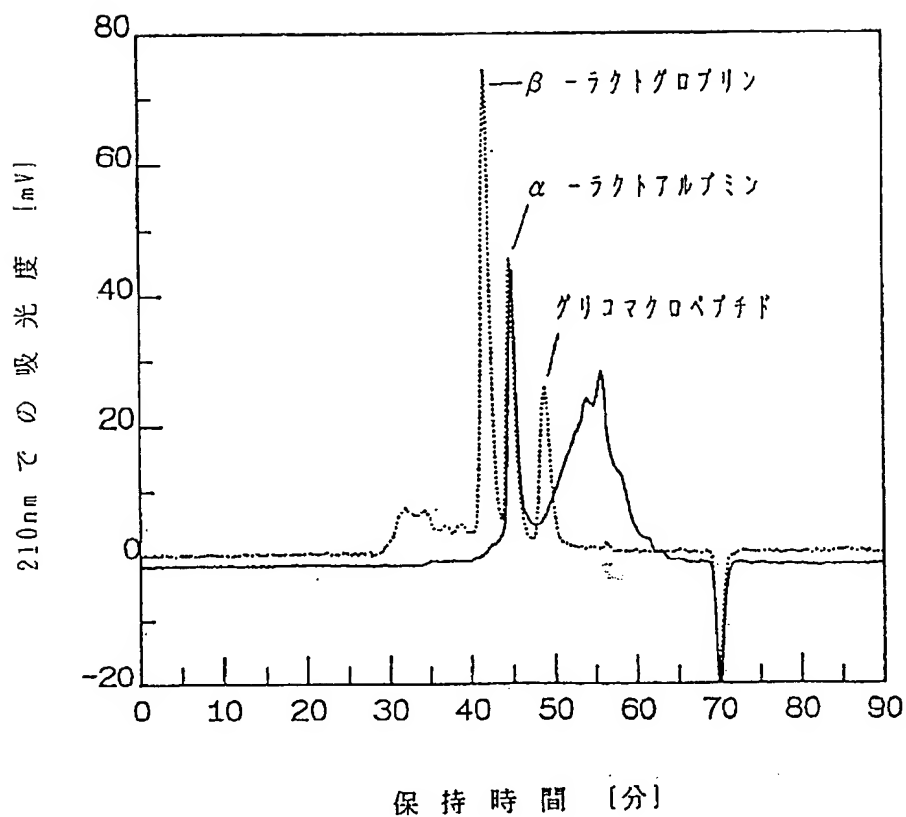
【図6】実施例1のPCAによる免疫原性評価結果を示す。

【図7】実施例2のPCAによる免疫原性評価結果を示す。

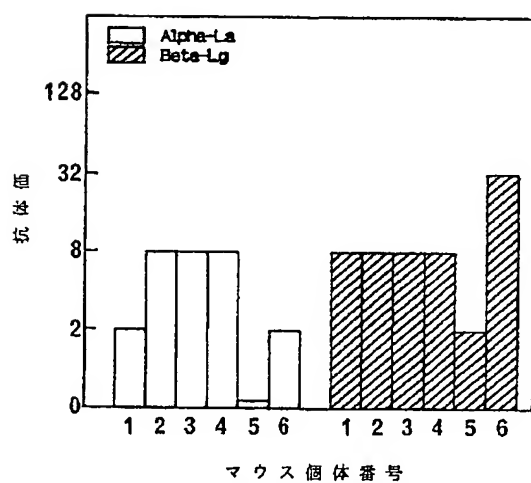
【図8】比較例1のPCAによる免疫原性評価結果を示す。

【図9】比較例2のPCAによる免疫原性評価結果を示す。

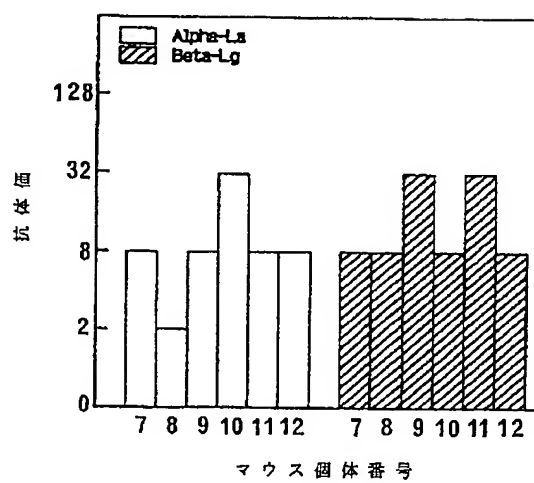
【図1】



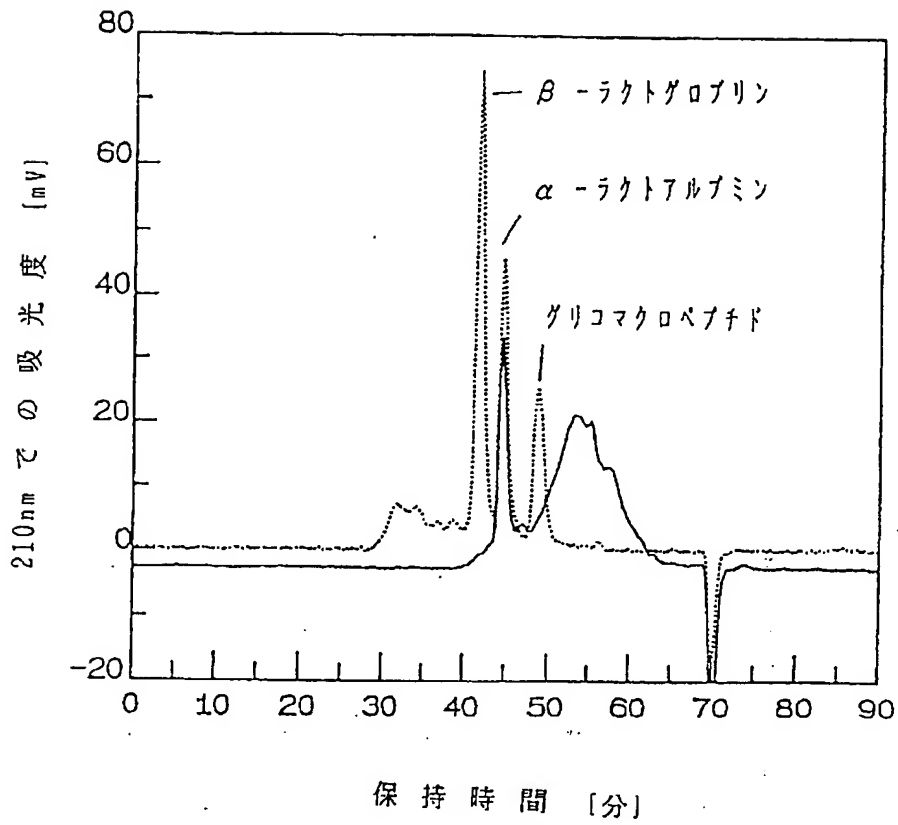
【図6】



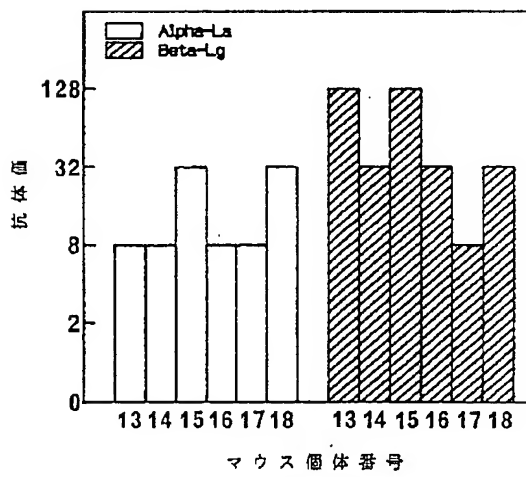
【図7】



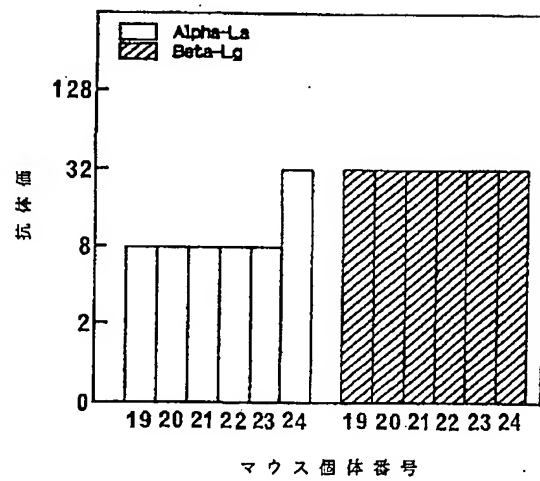
【図2】



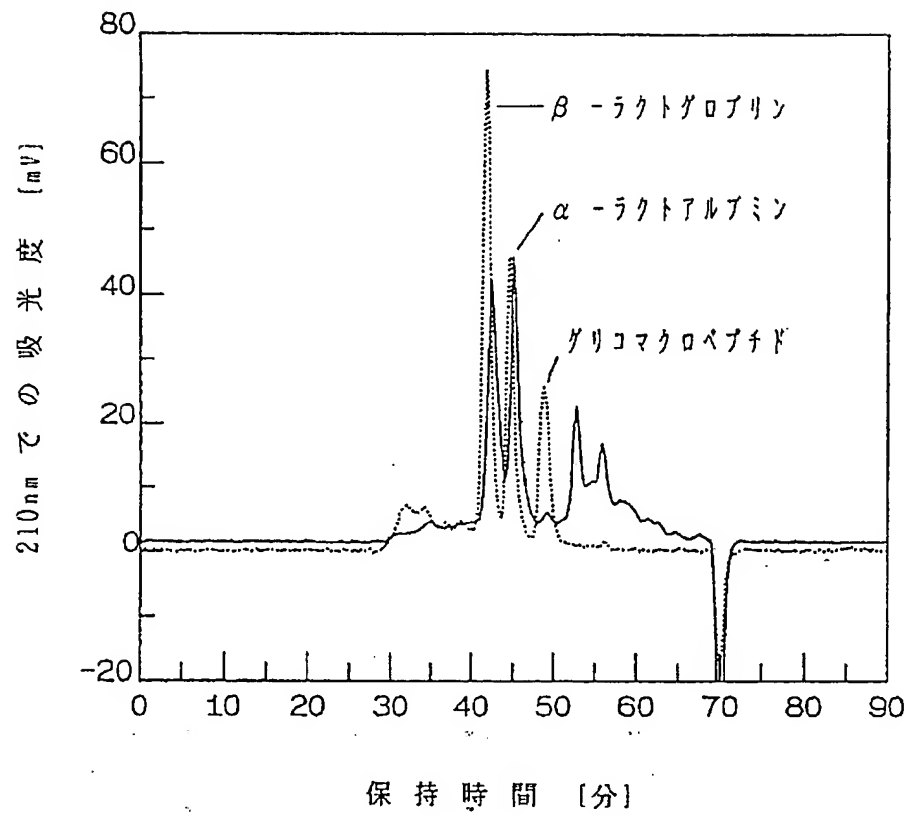
【図8】



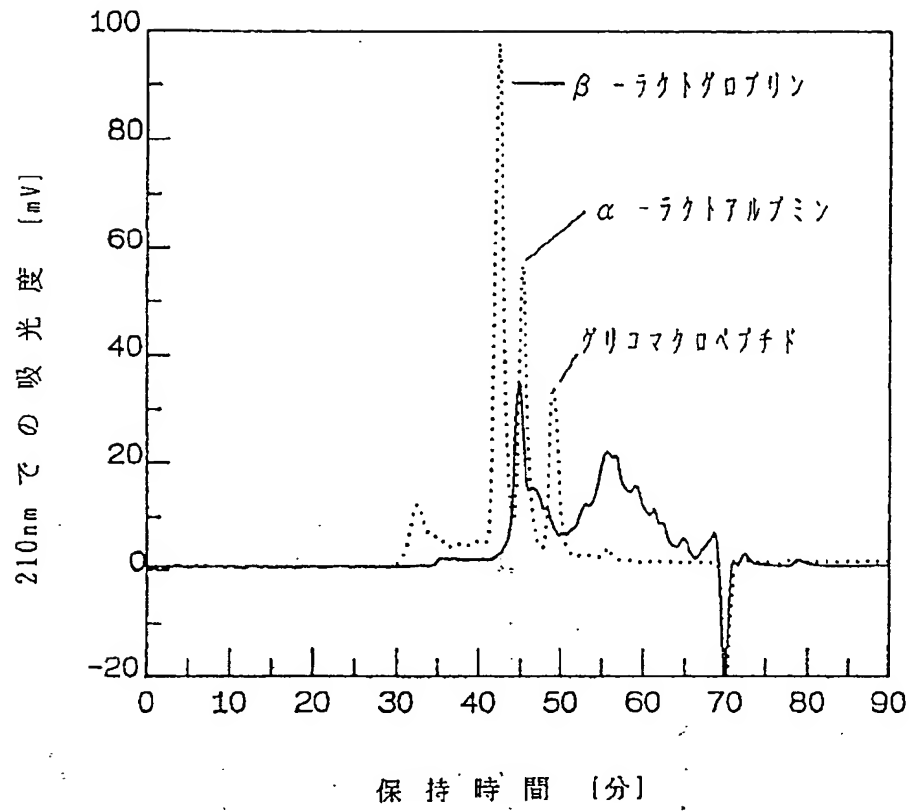
【図9】



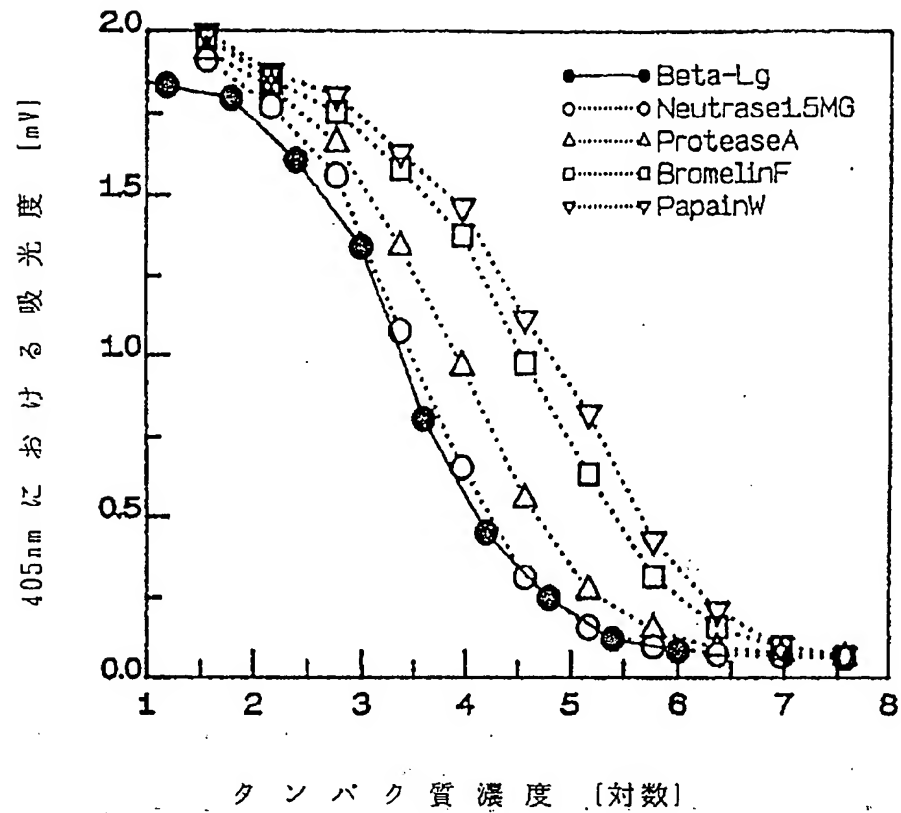
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 中村 哲郎

埼玉県入間市下藤沢580-5

(72)発明者 高橋 伸彰

埼玉県川越市新宿町5-11-3 雪印乳業
株式会社独身寮

(72)発明者 島谷 雅治

埼玉県狭山市新狭山3-1-2 レジデンス
新狭山303

(72)発明者 平野 賢一

愛知県岩倉市稻荷町稻荷西212-11

(72)発明者 伊藤 浩史

愛知県岩倉市稻荷町221